

**Directed mutagenesis of nucleic acid useful e.g. for codon optimization, comprises polymerization-ligation reaction of cloned fragment in presence of mutagenic oligonucleotide**

**Patent number:** FR2789696  
**Publication date:** 2000-08-18  
**Inventor:** DELCOURT MARC; BLESA STEPHANE  
**Applicant:** BIOMETHODES (FR)  
**Classification:**  
- **international:** C12Q1/68; C12N15/74; C07H21/00  
- **european:** C12N15/10B  
**Application number:** FR19990001719 19990212  
**Priority number(s):** FR19990001719 19990212

**Abstract of FR2789696**

Mutagenesis of a nucleic acid fragment (I) comprising cloning (I) into a vector, practically free of restriction enzyme (RE) cleavage sites, and circular polymerization-ligation of the vector with an oligonucleotide (ON) homologous with the region of (I) to be mutated, is new. ON introduces into (I) at least one required mutation and at least one screening mutation causing resistance to RE. Independent claims are also included for the following: (1) a vector for use in the novel process; (2) ON for use in the novel process; and (3) a kit for performing the novel process comprising a vector and optionally ON, buffer, heat-stable polymerase and ligase, deoxyribonucleotides and bacteria competent for transformation.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 789 696

(21) N° d'enregistrement national :

99 01719

(51) Int Cl<sup>7</sup> : C 12 Q 1/68, C 12 N 15/74, C 07 H 21/00

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 12.02.99.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : BIOMETHODES Société à responsa-  
bilité limitée — FR.

(43) Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 18.08.00 Bulletin 00/33.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du  
présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

(72) Inventeur(s) : BLESA STEPHANE et DELCOURT  
MARC.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : BREESE MAJEROWICZ.

(54) PROCÉDÉ DE MUTAGENÈSE D'UN FRAGMENT D'ACIDE NUCLÉIQUE PAR CLONAGE ET  
POLYMERISATION-LIGATION.

(57) La présente invention concerne un procédé de muta-  
genèse d'un fragment d'acide nucléique caractérisé en ce  
qu'il comprend les étapes suivantes: (a) le clonage dudit  
fragment dans un vecteur, substantiellement dépourvu de  
sites de clivage par les enzymes de restriction, (b) une réac-  
tion de polymérisation-ligation circulaire du vecteur obtenu  
à l'étape (a) en présence d'un ou plusieurs oligonucléotides  
substantiellement homologues à une région du fragment  
d'acide nucléique à muter, et permettant d'introduire les mu-  
tations suivantes au niveau du fragment d'acide nucléique à  
muter: (i) la ou les mutations recherchées, et (ii) au moins  
une mutation de criblage induisant la résistance du vecteur  
contenant le fragment d'acide nucléique muté à une ou plu-  
sieurs enzymes de restriction pour son criblage.

FR 2 789 696 - A1



PROCÉDÉ DE MUTAGENÈSE D'UN FRAGMENT D'ACIDE  
NUCLÉIQUE PAR CLONAGE ET POLYMERISATION-LIGATION.

5                   La présente invention concerne le domaine de la biologie moléculaire et se rapporte plus précisément à la mutagenèse dirigée de fragments d'ADN.

10                  La mutagenèse dirigée de fragments d'ADN est un domaine en pleine expansion, qui permet d'étudier de façon très précise l'implication de chacun des résidus d'une protéine dans la ou les activités de celle-ci. En effet, en 15 mutant successivement plusieurs résidus du fragments d'ADN qui pourra être transcrit en protéine, et en mesurant l'effet de chacune de ces mutations sur les activités de celle-ci, il est possible identifier les résidus intervenant dans chacune de ces activités.

20                  Un autre champ d'application de la mutagenèse dirigée est celui de l'optimisation codonique, qui consiste à effectuer des mutations silencieuses, c'est à dire n'affectant pas la séquence en acides aminés de la protéine traduite à partir de cet ADN, mais permettant son expression dans de meilleures conditions dans un ou plusieurs hôtes d'expression. Ainsi, par exemple, les 25 cellules de drosophiles, classiquement employées dans le cadre de l'expression de transgènes, n'utilisent pas préférentiellement les mêmes codons que les souches bactériennes pour traduire les ARNm en protéines. De même il est possible d'observer des différences dans l'utilisation des codons entre différentes souches 30 bactériennes.

35                  Différentes techniques de mutagenèse ont été décrites. La première utilisait le phage M13 sous ses différentes formes simple ou double brin (Higuchi, R et al, Nucleic Acid Research, 1988, Vol. 16, pages 7351 à 7367).

Cette technique, pour des raisons d'efficacité, a ensuite été remplacée par diverses techniques utilisant la PCR, comme notamment celle des PCR chevauchantes (Ho, SN et al, Gene 1989, Vol. 77, pages 51 à 59). Cette dernière technique nécessite deux amplifications successives du fragment d'ADN à muter, séparées entre elles par des étapes de purification sur gel. Cette technique est donc devenue obsolète, en raison d'une part du trop grand nombre de cycles nécessaires (2x25 le plus souvent), qui constitue un facteur de mutations aléatoires dues aux erreurs de copie des polymérase thermostables, et d'autre part au caractère toujours fastidieux de ladite technique car chaque mutation nécessite plusieurs jours de travail.

Récemment, différentes techniques faisant intervenir des réactions de polymérisation couplées à des réactions de ligation ont permis d'aboutir à des systèmes de mutagenèse plus efficaces, bien qu'encore imparfaits.

Ainsi, il a tout d'abord été proposé une méthode comprenant l'intégration d'un oligonucléotide muté lors d'une réaction de polymérisation-ligation en chaîne (Scott F. Michael, BioTechniques, 1994, Vol. 16, pages 410 à 412). Le produit obtenu, bien que contenant dans certains cas l'oligonucléotide muté, doit cependant être purifié sur gel et sous-cloné dans un vecteur pour pouvoir être utilisable, ce qui n'allège que peu le caractère fastidieux de la technique de mutagenèse initiale.

Une technique de réaction circulaire de polymérisation-ligation en chaîne a également été envisagée. Cette technique permet l'intégration de mutations lors de ladite réaction. Toutefois, cette technique ne prévoit pas de moyens de criblage pour les mutations n'affectant pas un site de restriction particulier (Chen Z, Nucleic Acid research, 1998, Vol. 26, pages 1126 et 1127), ce qui constituent la majorité des cas.

Enfin, une technique de réPLICATION d'une molécule d'ADN circulaire permettant l'intégration d'oligonucléotides marqués a été commercialisée en 1998 par la société Promega (Système GeneEditor, catalogue 1999, chapitre 8, page 14). Ce système est basé sur l'utilisation d'une polymérase et d'une ligase thermosensible, ce qui ne rend possible qu'une seule réPLICATION. Un procédé de double transformations dans des souches bactériennes particulières est ensuite utilisé pour récupérer les molécules d'ADN ayant intégré l'oligonucléotide muté, puis celles-ci sont sélectionnées sur un critère de modification de leur résistance à des antibiotiques, une seconde mutation affectant le gène de résistance aux antibiotiques du plasmide étant théoriquement associée à la mutation recherchée. Si cette technique allège le travail nécessaire à l'obtention d'une mutation d'un fragment d'ADN, certains points restent problématiques, comme la nécessité fastidieuse d'opérer deux transformations successives des molécules d'ADN à muter, l'impossibilité d'effectuer simultanément plusieurs mutations, ou encore comme la limitation actuelle du système aux vecteurs contenant un gène de résistance à l'ampicilline uniquement.

La présente invention se rapporte à une technique de mutagenèse dirigée ne présentant pas les inconvénients ci-dessus. Notamment, le procédé de l'invention est plus rapide et permet de s'affranchir d'étapes de purification sur gel ou de doubles transformations dans des souches bactériennes particulières.

Ce but est atteint selon l'invention grâce à procédé de mutagénèse d'un fragment d'acide nucléique, comme un fragment d'ADN, fondé sur les étapes suivantes :

a) le clonage dudit fragment dans un vecteur, comme un plasmide, substantiellement dépourvu de sites de clivage par les enzymes de restriction,

b) une réaction de polymérisation-ligation circulaire du vecteur obtenu à l'étape (a) en présence d'un ou plusieurs oligonucléotides substantiellement homologues à une région du fragment d'acide nucléique à muter, et permettant d'introduire les mutations suivantes au niveau du fragment d'acide nucléique à muter : (i) la ou les mutations recherchées et (ii) au moins une mutation induisant la résistance du vecteur contenant le fragment d'acide nucléique muté à une ou plusieurs enzymes de restriction pour le criblage desdits vecteurs, cette seconde mutation sera aussi désignée ci-après "mutation silencieuse de criblage".

Selon une forme de mise en œuvre préférée du procédé de l'invention, on utilise un seul oligonucléotide portant les mutations suivantes :

- au moins une mutation recherchée,  
- la mutation silencieuse de criblage.

Cette forme de mise en œuvre correspond au cas le plus fréquent où la mutation recherchée est voisine, c'est à dire distante de moins de 80 bases, d'un site de restriction unique, c'est-à-dire présent une seule fois sur l'ensemble constitué du fragment et du vecteur. Dans le cas où l'on souhaite introduire plusieurs mutations recherchées, et si les sites à muter sont proches, on peut utiliser un oligonucléotide qui contient une mutation silencieuse de criblage, et plusieurs mutations recherchées simultanément. Dans ce cas, il est aussi possible d'utiliser simultanément une série d'oligonucléotides jointifs, comportant chacun la ou les mutations désirées et/ou une ou plusieurs mutations silencieuses de criblage.

Selon une seconde forme de mise en œuvre du procédé de l'invention, on utilise deux oligonucléotides l'un portant la ou les mutations recherchées et l'autre la ou les mutations silencieuses de criblage. Cette forme de mise en œuvre correspond à un cas peu fréquent où la mutation à effectuer n'est pas située à proximité d'un site unique de restriction. Ces deux oligonucléotides, complémentaires de brins opposés, peuvent induire l'amplification du fragment d'ADN dont ils sont les bornes.

La position d'hybridation de l'oligonucléotide contenant la mutation de criblage se situe préférentiellement au niveau d'un des sites uniques du fragment d'ADN inséré, mais peut également se situer au niveau d'un site unique encore présent sur le vecteur. Dans le cas où on souhaite obtenir simultanément plusieurs mutations recherchées trop éloignées pour pouvoir être contenues sur un seul oligonucléotide, on synthétise plusieurs oligonucléotides, chacun d'eux portant deux mutation : la première d'entre elles étant la mutation recherchée, la seconde étant la mutation silencieuse de criblage permettant de détruire un site enzymatique unique situé à proximité.

Le procédé de l'invention vise tout particulièrement le cas de l'introduction dans le fragment d'acide nucléique d'une seule mutation qui est voisine, c'est à dire distante de moins de 80 bases, d'un site de restriction unique. Toutefois, les caractéristiques du procédé de l'invention décrites ci-après visent également la mutagénèse d'un fragment d'acide nucléique consistant à introduire plusieurs mutations recherchées, et mettant en œuvre un ou plusieurs oligonucléotides conformément aux deux modes de mise en œuvre indiquées ci-dessus.

Le procédé est remarquable en ce que l'oligonucléotide utilisé pour l'étape (b) est

substantiellement homologue à une région du fragment d'acide nucléique à muter tout en permettant d'introduire deux mutations :

5 (i) une première mutation qui est la mutation recherchée,

(ii) une seconde mutation silencieuse de criblage qui détruit un site de restriction unique présent sur le fragment d'ADN à muter et qui se situe à proximité du site de la première mutation, utile pour cibler les vecteurs ayant intégré ledit oligonucléotide et donc le fragment d'acide nucléique muté.

10 L'oligonucléotide est phosphorylé à son extrémité 5'.

15 On entend par substantiellement homologue, le fait que la séquence de l'oligonucléotide est suffisamment complémentaire d'une région du fragment d'acide nucléique pour permettre leur hybridation dans des conditions de stringence moyenne mais contient au moins les deux mutations indiquées ci-dessus.

20 De même, on entend par vecteur substantiellement dépourvu de sites de clivage par les enzymes de restriction, tout vecteur ne comportant aucun site de restriction hexanucléotidique ou un nombre réduit de tels sites, plus particulièrement, l'invention envisage un vecteur ne comprenant pas de site hexanucléotidique reconnu par plus de 50 enzymes de restriction disponibles dans le commerce (catalogue New England Bioloabs Inc., 1999, chapitre 18).

25 Plus particulièrement, le procédé de l'invention comprend après les étapes (a) et (b), les étapes suivants :

30 c) la digestion du produit de la réaction de polymérisation-ligation en chaîne par une ou plusieurs enzyme de restriction correspondant à chaque mutation

silencieuse de criblage, c'est-à-dire l'enzyme de restriction dont le site est perdu lorsque l'oligonucléotide est intégré dans le vecteur ayant intégré le fragment d'acide nucléique à muter.

5                   d) La transformation des produits de la digestion de l'étape (c) dans des bactéries compétentes, et le criblage desdites bactéries avec l'agent de sélection correspondant à un gène de résistance présent sur le vecteur.

10                  e) La vérification par toutes méthodes connues de l'homme du métier que des bactéries possèdent la mutation introduite dans le fragment d'acide nucléique. De préférence, cette vérification est effectuée par minipréparation d'ADN plasmidique, par PCR sur colonies ou  
15                  par séquençage.

Une représentation schématique du procédé de l'invention est donnée à la figure 1. Le procédé de l'invention est remarquable en ce que le pourcentage de molécules d'ADN ayant effectivement intégré la mutation recherchée, ainsi que la mutation servant au criblage, passe d'une fraction inférieure à 1/1000 avant le premier criblage de l'étape (c), à une fraction comprise entre 1/20 et 1/2 après.

25                  Une forme détaillée de mise en œuvre du procédé de l'invention comprend les étapes suivantes :

30                  a) On mélange :  
                      - un vecteur substantiellement dépourvu de sites d'enzymes de restriction contenant le fragment d'ADN à muter,

35                 - un oligonucléotide phosphorylé à son extrémité 5' substantiellement homologue à une région du fragment à muter, et comprenant deux mutations, une première mutation correspondant à la mutation recherchée,

et une seconde mutation silencieuse de criblage détruisant un site de restriction unique présent sur le fragment d'ADN à muter à proximité du site de la première mutation, utile pour cibler les vecteurs ayant intégré ledit oligonucléotide et donc le fragment d'acide nucléique muté.

- une polymérase thermostable,
  - une ligase thermostable
  - un tampon permettant l'activité de la

et de la ligase thermostables,

  - les quatre desoxy-nucléotides triphosphates.

10 - les quatre desoxy-nucléotides triphosphates.  
- un ou plusieurs oligonucléotides complémentaires du vecteur et servant de relais pour une réaction d'amplification-ligation

15 b) on effectue une réaction de polymérisation en chaîne à l'aide d'un thermocycleur, dont les cycles sont constitués de trois paliers de températures :

- la température du premier palier est comprise entre 90 et 98 °C, et correspond à l'étape de dénaturation de l'ADN,

20 - la température du second palier est comprise entre 40 et 72 °C, de préférence 50 à 60 °C, et correspond à l'étape de liaison des oligonucléotides sur la matrice d'ADN que constitue le vecteur.

25 - la température de la troisième étape est comprise entre 65 et 75°C, et correspond à la phase d'elongation et de ligation des fragments d'ADN néosynthétisés. Avantageusement le nombre de cycles de l'étape (b) est compris entre 2 et 100, de préférence 8 à 30.

30 c) On digère le produit de la réaction de polymérisation-ligation en chaîne par l'enzyme de restriction correspondant à la mutation silencieuse de criblage, c'est-à-dire l'enzyme de restriction dont le site est perdu lorsque l'oligonucléotide est intégré dans le

vecteur ayant intégré le fragment d'acide nucléique nucléique à muter.

5 d) On transforme le produit de cette digestion dans des bactéries compétentes, et on laisse les bactéries pousser sur une boite de petri contenant l'agent de sélection correspondant à un gène de résistance présent sur le vecteur.

10 e) On vérifie par toutes les méthodes connues de l'homme du métier, et préférentiellement par minipréparation d'ADN plasmidique, par PCR sur colonies ou par séquençage, que certaines des colonies bactériennes présentes sur la boites de petri de l'étape (d), possèdent la mutation introduite dans le fragment d'acide nucléique.

15 Des caractéristiques supplémentaires du procédé de l'invention et des moyens de sa mise en œuvre sont donnés ci-après.

1) Le vecteur.

20 Le vecteur utilisé à l'étape (a) du procédé de l'invention est avantageusement une molécule d'ADN circulaire, comme un plasmide, de taille comprise entre 1000 et 10000 paires de bases, et préférentiellement de 4000 à 6000. Outre une origine de réPLICATION et un gène de résistance à un antibiotique, ledit vecteur contient un 25 promoteur permettant l'expression d'un fragment d'ADN lorsque celui est inséré au niveau du polylinker. Le promoteur utilisé est préférentiellement versatile, de façon à ce qu'il puisse être actif dans un grand nombre de lignées ou tissus. A titre d'exemple, il peut s'agir du promoteur SRalpha. Le vecteur contient en outre un site de 30 polyadénylation permettant, dans les cellules eucaryotes, l'expression stable d'ARNm à partir du fragment d'ADN inséré au niveau du polylinker.

35 La caractéristique principale de ce vecteur est qu'il est substantiellement dépourvu de sites de

restriction, c'est à dire que 50 à 100 des sites de restriction correspondant à des enzymes classiquement utilisées sont absents de ce vecteur. Lorsqu'un fragment d'ADN est inséré au niveau du polylinker de ce vecteur, certaines parmi lesdites enzymes de restriction possèdent un site unique au niveau de cet ensemble constitué du vecteur et du fragment cloné. En moyenne, on retrouve un tel site unique toutes les 80 bases environ lorsque le nombre d'enzymes est 53 et la taille de l'insert 1000 paires de bases.

10 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 9999 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10099 10100 10101 10102 10103 10104 10105 10106 10107 10108 10109 10110 10111 10112 10113 10114 10115 10116 10117 10118 10119 10120 10121 10122 10123 10124 10125 10126 10127 10128 10129 10130 10131 10132 10133 10134 10135 10136 10137 10138 10139 10140 10141 10142 10143 10144 10145 10146 10147 10148 10149 10150 10151 10152 10153 10154 10155 10156 10157 10158 10159 10160 10161 10162 10163 10164 10165 10166 10167 10168 10169 10170 10171 10172 10173 10174 10175 10176 10177 10178 10179 10180 10181 10182 10183 10184 10185 10186 10187 10188 10189 10190 10191 10192 10193 10194 10195 10196 10197 10198 10199 10200 10201 10202 10203 10204 10205 10206 10207 10208 10209 10210 10211 10212 10213 10214 10215 10216 10217 10218 10219 10220 10221 10222 10223 10224 10225 10226 10227 10228 10229 10230 10231 10232 10233 10234 10235 10236 10237 10238 10239 10240 10241 10242 10243 10244 10245 10246 10247 10248 10249 10250 10251 10252 10253 10254 10255 10256 10257 10258 10259 10260 10261 10262 10263 10264 10265 10266 10267 10268 10269 10270 10271 10272 10273 10274 10275 10276 10277 10278 10279 10280 10281 10282 10283 10284 10285 10286 10287 10288 10289 10290 10291 10292 10293 10294 10295 10296 10297 10298 10299 10300 10301 10302 10303 10304 10305 10306 10307 10308

restriction, c'est à dire que 50 à 100 des sites de restriction correspondant à des enzymes classiquement utilisées sont absents de ce vecteur. Lorsqu'un fragment d'ADN est inséré au niveau du polylinker de ce vecteur, certaines parmi lesdites enzymes de restriction possèdent un site unique au niveau de cet ensemble constitué du vecteur et du fragment cloné. En moyenne, on retrouve un tel site unique toutes les 80 bases environ lorsque le nombre d'enzymes est 53 et la taille de l'insert 1000 paires de bases.

10           2) L'oligonucléotide.

La mutagenèse réalisée à l'étape (b) du procédé de l'invention, met en oeuvre un oligonucléotide construit de façon à introduire la mutation dans le fragment d'ADN. Celui-ci possède les caractéristiques suivantes :

15           - Il est实质iellement complémentaire à un segment du fragment d'ADN à muter, ce segment est défini par la position à muter d'un côté et le plus proche site unique de restriction de l'autre. Avantageusement, la taille de l'oligonucléotide dépasse ces deux positions de 5 à 50 bases, de préférence de 5 à 20 bases et tout préférentiellement de 9 bases.

20           - Il contient deux mutations, la première étant la position à muter, la seconde étant une des positions du site unique de restriction le plus proche de celle-ci, qui sera ainsi perdu.

25           - Il présente une taille comprise entre 10 et 1000 nucléotides.

30           Dans un premier exemple de mise en oeuvre, il est simple brin et sa taille est comprise entre 10 et 100 nucléotides. Il est dans ce cas préférentiellement obtenu par synthèse chimique.

35           Dans un second mode de mise en oeuvre, il est double brin, et sa taille est comprise entre 50 et 4000 nucléotides, de préférence 100 à 1000 nucléotide. Il aura

été obtenu par PCR à partir de deux oligonucléotides contenant pour l'un la mutation recherchée et pour l'autre la mutation silencieuse de criblage, et sera aussi désigné par la suite comme « megaprimer ».

5

- Il doit être phosphorylé en position 5'.

10

Une représentation schématique d'un vecteur contenant le fragment d'acide nucléique à muter, et l'oligonucléotide servant à effectuer la mutation, est donné à la figure 2. Dans cette figure, le fragment d'ADN, est représenté par le rectangle. Les barres verticales présentes dans le rectangle représentent les sites de restrictions présents une seule fois sur l'ensemble constitué du vecteur et du fragment d'ADN. L'oligonucléotide représenté au dessus du fragment d'ADN comporte deux mutations, l'une d'entre elles étant la mutation recherchée (celle de droite), l'autre, silencieuse, sert à abolir un site de restriction, ce qui permettra le criblage des fragments d'ADN ayant intégré l'oligonucléotide.

20

### 3) La réaction de polymérisation-ligation.

25

Le fragment d'acide nucléique à muter subit une réaction de polymérisation-ligation, effectuée au moyen d'une polymérase thermostable, d'une ligase thermostable et de l'oligonucléotide contenant les deux mutations décrit ci-dessus. Cette réaction se fait en outre en présence d'oligonucléotides complémentaires de différentes régions du vecteur ayant fonction de relais, d'un tampon permettant l'activité des deux enzymes, et de désoxy-nucléotides triphosphates. Un contrôle négatif peut être réalisé, contenant la totalité des éléments à l'exception de l'oligonucléotide contenant les deux mutations.

30

Ce mélange de polymérisation-ligation est soumis à une série de cycles de températures. Le premier palier de température est réalisé à 94°C environ, pendant 1

35

minute environ, et a pour vocation de dénaturer les molécules d'ADN hybridées entre elles. Le second palier est réalisé à une température comprise entre 40 et 72°C, de préférence 50 à 60°C, pendant 1 minute environ, et a pour vocation de permettre l'hybridation des différents oligonucléotides sur la matrice d'ADN constituée de chacun des brins du vecteur contenant le fragment à muter. Le troisième palier a lieu à une température comprise entre 65 et 75 °C pendant 1 à 10 minutes, de préférence 4, et a pour objet de permettre l'amplification à partir des oligonucléotides, et la liaison des fragments amplifiés lorsque l'extrémité 3' de l'un a rejoint l'extrémité phosphorylée 5' du suivant. Le nombre de cycles à effectuer est compris entre un minimum de deux et un maximum de 100 cycles, et est préférentiellement voisin de 10.

4) Le premier criblage des molécules circulaires ayant intégré l'oligonucléotide muté.

Une première étape de criblage est très utile car moins d'une molécule d'ADN sur 1000 est généralement porteuse de la mutation recherchée à l'issue de la réaction de polymérisation-ligation. Cette première étape de criblage permet de cliver la majorité des vecteurs n'ayant pas intégré l'oligonucléotide muté, de façon à les rendre inaptes à être transformées dans des bactéries.

Le mélange obtenu à l'issue de la réaction de polymérisation-ligation en chaîne est soumis à une digestion au moyen de l'enzyme dont le site unique sur le fragment d'ADN à muter est détruit lorsque l'oligonucléotide contenant les deux mutations est intégré dans la séquence. Cette enzyme de restriction, différente d'une expérience de mutagenèse à une autre, sera référencée dans la suite comme "enzyme de criblage".

Pour ce faire, une fraction du mélange de réaction, 10 µl dans les exemples de réalisation, sont

prélevés à l'issue des cycles de température, et soumis à une réaction en présence de 2 µl de l'enzyme de restriction utilisée pour le criblage, de 2 µl de son tampon 10X, et de 6 µl d'eau, pendant une durée d'au moins une heure. En 5 parallèle, la réaction contenant le contrôle négatif est également soumis à cette étape de digestion dans les mêmes conditions.

10 5) L'amplification des molécules circulaires obtenues après le premier criblage.

Les produits obtenus à l'issue du premier criblage sont transformés dans des bactéries compétentes, de façon à ce que certaines des molécules présentes dans le mélange soient amplifiées et récupérés en quantité suffisante pour pouvoir être analysées. Les bactéries 15 compétentes ainsi transformées sont ensuite étalées sur une boite de petri contenant l'antibiotique permettant de sélectionner les bactéries ayant intégré le vecteur contenant le fragment d'ADN muté ou non. Les boites de 20 petri sont incubées à 37°C pendant une durée minimale de 12 heures.

Le nombre de colonies obtenues par transformation du mélange correspondant à la réaction en 25 présence de l'oligonucléotide contenant les deux mutations est généralement 2 à 10 fois supérieur à celui obtenu dans le contrôle négatif, en l'absence dudit oligonucléotide.

6) Le second criblage.

Un second criblage est effectué pour but de 30 sélectionner une ou plusieurs colonies contenant le fragment d'ADN effectivement muté. Pour ce faire, une ou plusieurs colonies bactériennes sont individuellement examinées pour leur sensibilité à l'enzyme de restriction de criblage. Différentes possibilités existent. Parmi 35 celles-ci, deux techniques sont classiquement employées.

- La PCR sur colonies.

Cette technique repose sur l'amplification d'un segment contenant la position à muter, en utilisant des oligonucléotides de sens opposé situés de part et d'autre de celle-ci. Cette réaction peut être effectuée directement à partir de la colonie bactérienne, qui sera lysée lors de la réaction de PCR et dont l'ADN plasmidique, constitué du fragment effectivement muté ou non, constituera la matrice. Les produits amplifiés à partir de chacune des colonies sont ensuite soumis à une digestion par l'enzyme de restriction ayant déjà servi au premier criblage, et les colonies correspondant à des produits résistants à un tel clivage sont sélectionnées comme ayant intégré l'oligonucléotide à muter. La présence de la mutation recherchée est ensuite vérifiée par séquençage. ↵

10  
15 - La minipréparation d'ADN plasmidique et la digestion.

Les colonies obtenues peuvent être amplifiées par culture en milieu liquide, et l'ADN plasmidique en est extrait par minipréparation classique d'ADN. Les préparations plasmidiques obtenues sont ensuite testées pour leur sensibilité à l'enzyme de criblage. Les colonies correspondant à des produits résistants à un tel clivage sont sélectionnées comme ayant intégré l'oligonucléotide à muter. La présence de la mutation recherchée est ensuite vérifiée par séquençage.

20  
25 Le pourcentage de colonies bactériennes contenant effectivement la mutation recherchée est généralement compris entre 5 et 50%.

30

L'invention concerne aussi un kit pour la mise en œuvre du procédé décrit précédemment.

Un tel kit comprend :

35 - un vecteur, clivé ou non au niveau de son polylinker, substantiellement dépourvu d'enzymes de

restriction, et contenant un promoteur permettant l'expression, dans les cellules eucaryotes, des fragments d'ADN clonés au niveau de son polylinker;

5 - éventuellement des oligonucléotides nécessaires en tant que relais pour que la réaction de polymérisation-ligation (PLCR) se fasse;

10 - éventuellement un tampon compatible avec l'activité simultanée d'une polymérase thermostable et d'une ligase thermostable. Ce tampon est par exemple composé d'un mélange à concentrations égales de tampon correspondant à la polymérase thermostable et de celui correspondant à la ligase thermostable;

15 - éventuellement une polymérase thermostable par exemple la Taq polymérase;

20 - une ligase thermostable par exemple la Tth ligase;

- éventuellement une quantité suffisante de chacun des quatre désoxyribo-nucléotides;

25 - éventuellement, de bactéries compétentes aptes à être transformées.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent concernant quatre formes de mise en œuvre du procédé de mutagénèse d'un fragment d'ADN inséré dans le vecteur pBM.1. pBM.1 est un vecteur substantiellement dépourvu de sites de clivage par 53 enzymes de restriction classiquement commercialisées, et possédant le promoteur SRalpha, qui un promoteur permettant d'exprimer des transgènes dans de nombreux tissus et lignées (Takebe Y et al, Mol. Cell. Biol., 1988, Vol. 8, pages 466 à 472).

Exemple 1 : Cas d'une mutagenèse simple.

Cet exemple concerne le cas, le plus fréquent, où la mutation recherchée est voisine, c'est à dire distante de moins de 80 bases, d'un site de restriction unique, c'est-à-dire présent une seule fois sur l'ensemble fragment et vecteur. Le fait que le vecteur ait été 5 substantiellement débarrassé de ses sites de restriction implique que la majorité des sites de restriction présents sur le fragment d'ADN inséré dans le polylinker sera utilisable dans le cadre de cet exemple. En pratique, la 10 distance moyenne entre deux sites uniques de restriction est suffisamment faible pour que plus de 98% des nucléotides dudit fragment d'ADN soient distants de moins de 80 bases d'un de ces sites uniques.

Dans une premier mode de réalisation, le 15 fragment d'ADN intégré dans le vecteur est le gène eGPF. Un oligonucléotide 29mer phosphorylé en 5' correspondant aux positions 663 à 691 de ce gène a été synthétisé. Cet oligonucléotide, appelé eGFPAvaII, est identique à la séquence de la GFP à l'exception de deux positions : en 20 position 20, la thymidine originale a été remplacée par une cytosine. Cette modification correspond à la mutation recherchée. En position 11, une cytosine a été remplacée par une thymidine, détruisant ainsi le site AvaII présent à cet endroit (et à nul autre ni sur le fragment d'ADN inséré 25 ni sur le vecteur pBM.1). Cette enzyme AvaII sera utilisée dans cet exemple pour le criblage des mutants. La séquence de cet oligonucléotide est la suivante :

TCACATGGTCTGCTGGAGGTCGTGACCG,

Les deux positions soulignées indiquent les 30 nucléotides mutés par rapport à la séquence originale de la eGFP.

Le plasmide contenant le gène de la eGFP a été soumis à une réaction en chaîne de polymérase-ligase pendant 10 cycles de température organisés de la façon

suivante : 94°C : 1 minute. 50°C : 1 minute. 72°C : 4 minutes.

Le mélange de réaction était constitué de la façon suivante :

5	pBM.1 - eGFP (100 ng)	1 µl
	Oligo eGFPAvaII (2 pMoles)	1 µl
	Taq Polymérase (5 U)	0,5µl
	Tth ligase (40 U)	0,5 µl
	Tampon 10X Taq Pol	1,25 µl
10	Tampon 5X Tth Ligase	2,5 µl
	Mélange de relais 12 x 15pMoles	2 µl
	Eau désionisée	16,25 µl
	Total	25 µl

15 En parallèle avec cette réaction, une réaction ne différant que par l'absence de l'oligonucléotide eGFPAvaII a été menée.

A l'issue des cycles de température, 10 µl de chacune des deux réactions étaient prélevés, et soumis à la digestion pendant deux heures par l'enzyme de restriction AvaII, dans des conditions compatibles avec l'activité de cette enzyme. Le produit de digestion était ensuite transformé dans des bactéries comptétentes de souche DH10bêta, et étalé sur une boite de pétri.

25 Après une incubation de 12 heures, le nombre de colonies observées était d'environ 1000 sur la boite de pétri correspondant à la réaction totale, contre environ 100 colonies seulement sur la boite de pétri correspondant au contrôle négatif sans l'oligonucléotide eGFPAvaII.

30 95 des 1000 colonies ont été ensuite testées par la technique de PCR sur colonies en utilisant des oligonucléotides flanquant le gène eGFP. Les produits d'amplification étaient résistant au clivage par l'enzyme AvaII dans environ 47% des cas. Parmi les produits 35 d'amplification résistant au clivage par l'enzyme AvaII,

95% possédaient la mutation recherchée, en position 20 de l'oligonucléotide.

Exemple 2 : Utilisation d'un "mégaprimer".

5

Cet exemple correspond à une situation peu fréquente où la mutation à effectuer n'est pas située à proximité d'un site unique de restriction. Il est alors nécessaire d'utiliser deux oligonucléotides phosphorylés d'environ 20 bases, le premier possédant la mutation d'intérêt, et le second induisant, lorsqu'intégré, la résistance à l'enzyme de criblage. Ces deux oligonucléotides, complémentaires de brins opposés, peuvent induire l'amplification du fragment d'ADN dont ils sont les bornes. La position d'hybridation de l'oligonucléotide contenant la mutation de criblage se situe préférentiellement au niveau d'un des sites uniques du fragment d'ADN inséré, mais peut également se situer au niveau d'un site unique encore présent sur le vecteur.

20

Dans un premier temps, une réaction classique d'amplification de 10 à 25 cycles dans des conditions standard est effectuée, composée de la façon suivante :

25	pBM.1 - eGFP(100ng)	1 µl
	oligo Mutation (20 pM)	1 µl
	Oligo Criblage (20 pM)	1 µl
	Tampon Taq pol 10 x	2 µl
	Taq Pol (5U)	1 µl
	Eau désionisée	14 µl
30	Total	20 µl

A l'issue de cette amplification, des produits sont ajoutés, et le nouveau mélange subit à nouveau une série de 10 cycles dans les conditions de l'exemple 1 :

35	Mélange précédent	20 µl
	Tth Ligase (40 U)	0,5 µl

Tampon Tth ligase 5 X	2,5 µl
Mélange de relais 12 x 15pMoles	2 µl
Total	25 µl

A l'issue de ces 10 cycles, 10 µl du mélange sont prélevés et digérés par l'enzyme de criblage dans ses conditions optimales pendant deux heures. La suite de cet exemple est similaire à l'exemple 1, car il s'agit de cibler les molécules ayant effectivement intégré la mutation en transformant le mélange de digestion enzymatique dans des compétentes, et en analysant séparément les colonies obtenues en utilisant l'enzyme de criblage.

### Exemple 3 : Cas d'une mutagenèse multiple.

Dans une troisième mode de réalisation, on désire effectuer plusieurs mutations simultanées situées en différents sites du même fragment d'ADN inséré dans le plasmide pBM.1.

Dans le cas où les sites à muter sont proches, on peut utiliser un oligonucléotide qui contient une mutation silencieuse de criblage, et plusieurs mutations recherchées simultanément. La démarche suivie est alors la même que dans l'exemple 1.

Dans le cas où on cherche à obtenir simultanément plusieurs mutations trop éloignées pour pouvoir être contenues sur un seul oligonucléotide, on synthétise plusieurs oligonucléotides, chacun d'eux portant deux mutation : la première d'entre elles étant la mutation recherchée, la seconde étant la mutation détruisant un site enzymatique unique situé à proximité. Alternativement, les oligonucléotides peuvent être des mégaprimeres semblables à ceux décrits dans l'exemple 2.

Le processus se déroule comme dans le cas des exemples 1 ou 2, selon que le ou les oligonucléotides de

courts produits simple-brin issus de synthèse chimique ou, au contraire, des mégaprimer, à deux exceptions près : premièrement, toutes les enzymes de criblage doivent être utilisées sensiblement simultanément lors de la première 5 étape de criblage, pour éliminer les fragments n'ayant pas intégré l'ensemble des mutations. Deuxièmement, les colonies bactériennes doivent être sélectionnées séparément pour l'absence de chacun des sites de restriction concernés, et pour la présence de chacune des mutations projetées.

10

Exemple 4 : Application du procédé de l'invention à l'optimisation codonique.

Cet exemple vise le cas où l'on souhaite faire 15 un très grand nombre de mutations sur un même fragment d'ADN. Le cas le plus fréquent est lorsqu'on désire faire une optimisation des codons en vue de l'expression du fragment d'ADN dans tel ou tel système d'expression. Ainsi, pour une même séquence en acides aminés, les codons permettant une bonne expression de la protéine dans un 20 système d'expression sont-ils différents.

Dans ce cas, il est possible d'utiliser simultanément une série d'oligonucléotides phosphorylés et jointifs, comportant chacun la ou les mutations désirées 25 et/ou une ou plusieurs mutations permettant le criblage des fragments d'ADN ayant intégré ces oligonucléotides.

Le protocole est sensiblement semblable à celui décrit dans l'exemple 1, si tant est qu'une batterie d'enzymes de restrictions peuvent être utilisées sensiblement simultanément pour le criblage, et que les 30 fragments d'ADN mutés retenus à la fin du processus devront être intégralement séquencés pour vérifier que la totalité des mutations ont bien été introduites.

## REVENDICATIONS

5 1) Procédé de mutagénèse d'un fragment d'acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) le clonage dudit fragment dans un vecteur, substantiellement dépourvu de sites de clivage par les enzymes de restriction,

10 b) une réaction de polymérisation-ligation circulaire du vecteur obtenu à l'étape (a) en présence d'un ou plusieurs oligonucléotides substantiellement homologues à une région du fragment d'acide nucléique à muter, et permettant d'introduire les mutations suivantes au niveau du fragment d'acide nucléique à muter :

15 (i) la ou les mutations recherchées, et

(ii) au moins une mutation de criblage induisant la résistance du vecteur contenant le fragment d'acide nucléique muté à une ou plusieurs enzymes de restriction pour son criblage.

20 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que à l'étape (b) on utilise un ou plusieurs oligonucléotides portant chacun les mutations suivantes :

- 25 - au moins une mutation recherchée,  
- une mutation de criblage.

30 3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que à l'étape (b) on utilise plusieurs oligonucléotides jointifs.

35 4) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que à l'étape (b) on utilise deux oligonucléotides l'un portant la ou les mutations recherchées et l'autre la ou les mutations de criblage.

5) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que à l'étape (b) on utilise deux oligonucléotides complémentaires de brins opposés du vecteur.

5

6) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la mutation de criblage est une mutation qui détruit un site de restriction unique présent sur le fragment d'ADN à muter et qui se situe à proximité du site de la mutation recherchée.

10

7) Procédé de mutagénèse d'un fragment d'acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

15

a) le clonage dudit fragment dans un vecteur, substantiallement dépourvu de sites de clivage par les enzymes de restriction,

20

b) une réaction de polymérisation-ligation circulaire du vecteur obtenu à l'étape (a) en présence d'un oligonucléotide substantiallement homologue à une région du fragment d'acide nucléique à muter, et permettant d'introduire les mutations suivantes au niveau du fragment d'acide nucléique à muter :

25

(i) une première mutation qui est la mutation recherchée,

30

(ii) une seconde mutation silencieuse de criblage qui détruit un site de restriction unique présent sur le fragment d'acide nucléique à muter et qui se situe à proximité du site de la première mutation, utile pour cibler les vecteurs ayant intégré ledit oligonucléotide et donc le fragment d'acide nucléique muté.

35

8) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend après les étapes (a) et (b), les étapes suivants :

c) la digestion du produit de la réaction de polymérisation-ligation en chaîne par une ou plusieurs enzyme de restriction correspondant à chaque mutation silencieuse de criblage,

5 d) La transformation des produits de la digestion de l'étape (c) dans des bactéries compétentes, et le criblage desdites bactéries avec l'agent de sélection correspondant à un gène de résistance présent sur le vecteur.

10 e) La vérification par toutes méthodes connues de l'homme du métier que des bactéries possèdent la mutation introduite dans le fragment d'acide nucléique. De préférence, cette vérification est effectuée par minipréparation d'ADN plasmidique, par PCR sur colonies ou  
15 par séquençage.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) On mélange :

20 - un vecteur substantiellement dépourvu de sites d'enzymes de restriction contenant le fragment d'ADN à muter,

25 - un oligonucléotide phosphorylé à son extrémité 5' substantiellement homologue à une région du fragment à muter, et comprenant deux mutations, une première mutation correspondant à la mutation recherchée, et une seconde mutation silencieuse de criblage détruisant un site de restriction unique présent sur le fragment d'ADN à muter à proximité du site de la première mutation, utile pour cribler les vecteurs ayant intégré ledit oligonucléotide et donc le fragment d'acide nucléique muté.

30 - une polymérase thermostable,  
35 - une ligase thermostable  
- un tampon permettant l'activité de la polymérase et de la ligase thermostables,

- les quatre desoxy-nucléotides triphosphates.

- un ou plusieurs oligonucléotides complémentaires du vecteur et servant de relais pour une réaction d'amplification-ligation

5 b) on effectue une réaction de polymérisation en chaîne à l'aide d'un thermocycleur, dont les cycles sont constitués de trois paliers de températures :

10 - la température du premier palier est comprise entre 90 et 98 °C, et correspond à l'étape de dénaturation de l'ADN,

15 - la température du second palier est comprise entre 40 et 72 °C, de préférence 50 à 60 °C, et correspond à l'étape de liaison des oligonucléotides sur la matrice d'ADN que constitue le vecteur.

20 - la température de la troisième étape est comprise entre 65 et 75°C, et correspond à la phase d'elongation et de ligation des fragments d'ADN néosynthétisés. Avantageusement le nombre de cycles de l'étape (b) est compris entre 2 et 100, de préférence 8 à 30.

25 c) On digère le produit de la réaction de polymérisation-ligation en chaîne par l'enzyme de restriction correspondant à la mutation silencieuse de criblage, c'est-à-dire l'enzyme de restriction dont le site est perdu lorsque l'oligonucléotide est intégré dans le vecteur ayant intégré le fragment d'acide nucléique nucléique à muter.

30 d) On transforme le produit de cette digestion dans des bactéries compétentes, et on laisse les bactéries pousser sur une boîte de petri contenant l'agent de sélection correspondant à un gène de résistance présent sur le vecteur.

35 e) On vérifie par toutes les méthodes connues de l'homme du métier, et préférentiellement par minipréparation d'ADN plasmidique, par PCR sur colonies ou

par séquençage, que certaines des colonies bactériennes présentes sur la boites de petri de l'étape (d), possèdent la mutation introduite dans le fragment d'acide nucléique.

5               10) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la réaction de polymérisation-ligation de l'étape (b) est effectuée au moyen :

- d'une polymérase thermostable,

- d'une ligase thermostable,

10               - d'un ou plusieurs oligonucléotides permettant d'introduire au niveau du fragment d'acide nucléique à muter la ou les mutations recherchées et au moins une mutation de criblage induisant la résistance du vecteur contenant le fragment d'acide nucléique muté à une ou plusieurs enzymes de restriction pour son criblage,

15               - d'oligonucléotides complémentaires de différentes régions du vecteur ayant fonction de relais,

- d'un tampon permettant l'activité des deux

20               enzymes,

- de désoxy-nucléotides triphosphates.

25               11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la réaction de polymérisation-ligation de l'étape (b) comprend la série de cycles de températures suivants :

- le premier palier de température est réalisé à 94°C environ, pendant 1 minute environ,

30               - le second palier est réalisé à une température comprise entre 40 et 72°C, de préférence 50 à 60°C, pendant 1 minute environ,

- le troisième palier a lieu à une température comprise entre 65 et 75 °C pendant 1 à 10 minutes, de préférence 4 minutes,

et le nombre de cycles à effectuer est compris entre un minimum de deux et un maximum de 100 cycles, et est préférentiellement voisin de 10.

5                 12) Un vecteur pour être utilisé à l'étape (a) d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il est constitué d'une molécule d'ADN circulaire, comme un plasmide, de taille comprise entre 1000 et 10000 paires de bases, et préférentiellement de 4000 à 6000, substantiellement dépourvue de sites de restriction, et comprenant :

10                 - une origine de réPLICATION,  
15                 - un gène de résistance à un antibiotique,  
               - un promoteur permettant l'expression d'un fragment d'ADN lorsque celui est inséré au niveau du polylinker.

20                 13) Un vecteur selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il ne comprend pas les 50 à 100 sites de restriction correspondant aux enzymes classiquement utilisées.

25                 14) Un oligonucléotide pour être utilisé à l'étape (b) d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il présente les caractéristiques suivantes

30                 - Il est substantiellement complémentaire d'un segment du fragment d'ADN à muter, ce segment étant défini par la position à muter d'un côté et le plus proche site unique de restriction de l'autre, la taille dudit oligonucléotide dépasse ces deux positions de 5 à 50 bases, de préférence de 5 à 20 bases et tout préférentiellement de 9 bases.

35                 - Il contient deux mutations, la première étant la position à muter, la seconde étant une des positions du

site unique de restriction le plus proche de celle-ci, qui sera ainsi perdu.

- Il présente une taille comprise entre 10 et 1000 nucléotides.

5 - Il doit être phosphorylé en position 5'.

15) Un oligonucléotide selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est simple brin et sa taille est comprise entre 10 et 100 nucléotides.

10 16) Un oligonucléotide selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est double brin, et sa taille est comprise entre 50 et 4000 nucléotides, de préférence 100 à 1000 nucléotides.

15 17) Un kit pour la mise en œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend

20 - un vecteur, clivé ou non au niveau de son polylinker,实质iellement dépourvu d'enzymes de restriction, et contenant un promoteur permettant l'expression, dans les cellules eucaryotes, des fragments d'ADN clonés au niveau de son polylinker;

25 - éventuellement des oligonucléotides nécessaires en tant que relais pour que la réaction de polymérisation-ligation se fasse;

30 - éventuellement un tampon compatible avec l'activité simultanée d'une polymérase thermostable et d'une ligase thermostable. Ce tampon est par exemple composé d'un mélange à concentrations égales de tampon correspondant à la polymérase thermostable et de celui correspondant à la ligase thermostable;

- éventuellement une polymérase thermostable par exemple la Taq polymérase;

- une ligase thermostable par exemple la Tth ligase;
- éventuellement une quantité suffisante de chacun des quatre désoxyribo-nucléotides;
- 5 - éventuellement, de bactéries compétentes aptes à être transformées.

Fig.1

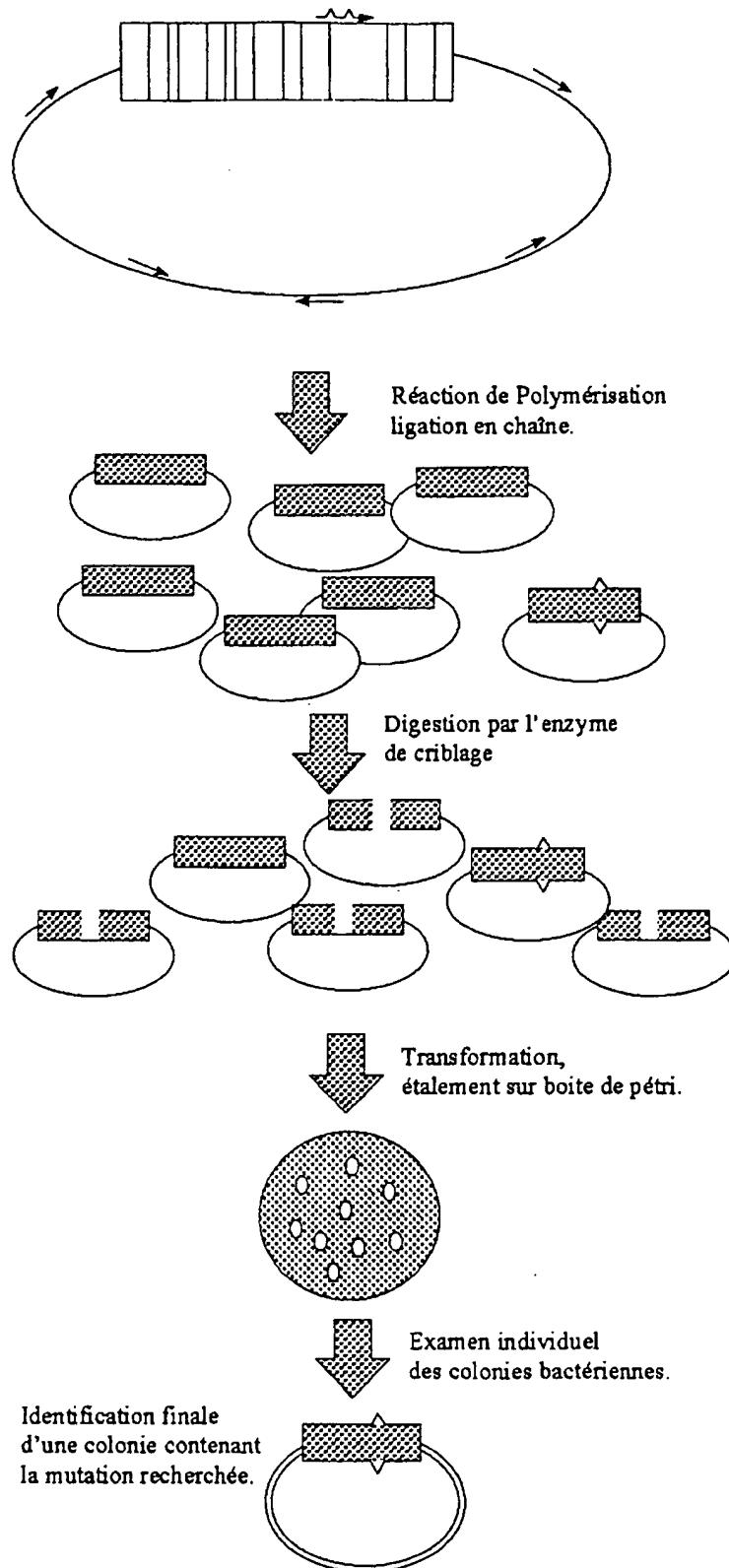
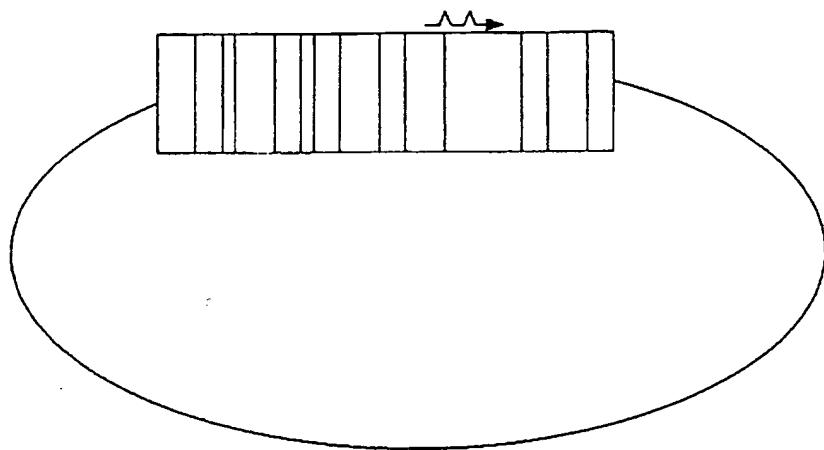


Fig.2



INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 571696  
FR 9901719

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 93 01282 A (BERLEX LAB) 21 janvier 1993 (1993-01-21) * le document en entier * ---	1
X	DENG W P & NIKOLOFF J A: "Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 200, 1 janvier 1992 (1992-01-01), pages 81-88, XP002096494 ISSN: 0003-2697 * le document en entier * ---	1,4
D,Y	CHEN Z, ET AL. : "Amplification of closed circular DNA in vitro." NUCLEIC ACIDS RES., vol. 26, no. 23, 1 décembre 1998 (1998-12-01), pages 1126-1127, XP002122693 * le document en entier * ---	1
Y	WO 98 02537 A (PROMEGA CORP) 22 janvier 1998 (1998-01-22) * le document en entier * ---	1
Y	WO 93 13216 A (HARVARD COLLEGE) 8 juillet 1993 (1993-07-08) * le document en entier * ---	1
Y,D	CATALOGUE PROMEGA: "GeneEditor TM In vitro site-directed mutagenesis system" SYSTÈME GENEDITOR, 1999, page 8.14 XP002122694 * le document en entier * ---	1
		-/-
2	Date d'achèvement de la recherche  16 novembre 1999	Examinateur  Chambonnet, F
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 571696  
FR 9901719

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examnée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO 97 46670 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY ; GIFFORD DAVID K (US)) 11 décembre 1997 (1997-12-11) * le document en entier * ---	1
A	JONES D H ET AL: "Production of a vector to facilitate DNA mutagenesis and recombination" BIOTECHNIQUES, vol. 4, no. 16, 1 janvier 1994 (1994-01-01), page 694 701 XP002076171 ISSN: 0736-6205 * le document en entier * ---	1
T	FR 2 772 048 A (BIOMETHODES) 11 juin 1999 (1999-06-11) * le document en entier * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
2	Date d'achèvement de la recherche  16 novembre 1999	Examinateur  Chambonnet, F
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**